

陳 述 書

特許庁長官 殿

本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

平成17年3月28日

国際出願の表示 2005年3月28日提出の国際出願

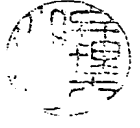
発明の名称 シノビオリン遺伝子のプロモーターに対するデコイ核酸

代理人 (9278) 弁理士 小林 浩

KOBAYASHI Hiroshi



フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

- 1 出願人名称 株式会社ロコモジェン
Locomogene, Inc.
- 2 代理人氏名 小林 浩 KOBAYASHI Hiroshi
- 3 国際出願の表示 2005年3月28日提出の国際出願 
- 4 発明の名称 シノビオリン遺伝子のプロモーターに対する
デコイ核酸
- 5 使用した文字コード シフトJISコード
- 6 配列を記載したファイル名
PCT05-0020.TXT
- 7 連絡先
 電話番号 03-3273-2611

 担当者氏名 小林 浩
 (担当 渡辺貴康)

シノビオリン遺伝子のプロモーターに対するデコイ核酸

5 技術分野

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターに対するデコイ核酸に関する。

背景技術

10 関節リウマチ(以下、RA という)は、関節の滑膜組織に異常な増殖が見られる全身性の慢性炎症性疾患である。本発明者は、この滑膜組織の異常増殖に必須の遺伝子としてシノビオリン(Synoviolin)遺伝子を同定している(WO 02/052007)。

シノビオリン遺伝子がコードしているシノビオリンは、関節リウマチ患者の滑膜細胞ライブラリーから、抗滑膜細胞抗体を用いた免疫スクリーニングによりクローニングされた膜タンパク質である。シノビオリンをマウスで過剰発現させた
15 場合、関節では、滑膜の増生、骨、軟骨破壊が認められ、関節炎と酷似した症状が確認されたため、軟骨・骨組織の発生、分化、再生および代謝へのシノビオリンの関与が示唆されている。また、最近では、シノビオリンが線維症、癌又は脳神経疾患の発症にも関与することが見出されている(Genes Dev. 2003 Vol. 17: p.2436-49)。

20 シノビオリンの発現量は上記の疾患において重要であると考えられるため、シノビオリンプロモーターの転写領域を検索するために、マウスシノビオリン遺伝子の上流プロモーター領域を切断して種々の長さを有する断片についてプロモーター活性を調べた結果、そのコア領域が特定され、転写因子と相互作用することが確認されている(Oncogene.2000 Vol. 19: p.6533-48)。

25

発明の開示

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写調節領域をコードする部位に対するデコイ核酸を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。そして、シノビオ

リン遺伝子の上記の部位に対するデコイ核酸を作製することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

- 5 (1) シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子転写因子と結合してプロモーター活性を阻害することができるデコイ核酸。

本発明のデコイ核酸は、例えば以下の (a) 又は (b) のデコイ核酸を例示することができる。

(a) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列からなるデコイ核酸

- 10 (b) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

また、本発明のデコイ核酸は、例えば以下の (a) 又は (b) のデコイ核酸を例示することができる。

(a) 配列番号 1 1 及び 1 2 に示される塩基配列からなるデコイ核酸

- 15 (b) 配列番号 1 1 及び 1 2 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能としては、例えばプロモーターの転写因子と結合する機能が挙げられる。

- 20 本発明のデコイ核酸は、プロモーターの転写因子の結合部位である EBS(Ets binding site)、SBS(Sp1 binding site)及び ABS(AML binding site)からなる群から選ばれるいずれかの部位の塩基配列に基づいて設計することができる。

また、本発明のデコイ核酸は、滑膜細胞、又は癌細胞にアポトーシスを誘導することができる。

- 25 (2) 上記デコイ核酸を含む、シノビオリン遺伝子の発現に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物。

本発明の医薬組成物は、さらに、薬学的に許容可能なキャリアーを含むものでもよい。本発明の医薬組成物の適用の対象となる疾患としては、例えば、関節リウマチ、線維症、癌及び脳神経疾患からなる群から選ばれる少なくとも 1 つが挙

げられる。

(3) 上記デコイ核酸を用いて、シノビオリンの転写因子の転写活性を阻害する方法。

(4) 上記デコイ核酸を用いて、シノビオリンのプロモーター活性を阻害する方法。

5 (5) 上記デコイ核酸を用いて、シノビオリンのプロモーター活性を阻害することにより、シノビオリンの発現を抑制する方法。

(6) 上記デコイ核酸を用いて、滑膜細胞、又は癌細胞にアポトーシスを誘導する方法。

10 図面の簡単な説明

図 1 A は、切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す図である。

図 1 B は、切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す図である。

図 1 C は、シノビオリンプロモーターの Ets 結合部位及びコア領域を示す図である。

15 図 1 D は、プロモーターに変異を導入したときの転写活性を示す図である。

図 2 A は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。

図 2 B は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。

図 2 C は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。

図 2 D は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。

20 図 3 A は、シノビオリンプロモーターの転写活性を示す図である。

図 3 B は、シノビオリンプロモーターの転写活性を示す図である。

図 3 C は、RNAi を利用してノックアウトした NIH3T3 細胞におけるシノビオリンプロモーターの転写活性を示す図である。

25 図 4 A は、2.2 k と 1 k のシノビオリンプロモーターに LacZ を結合したプラスミドの構築図である。

図 4 B は、マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真である。

図 4 C は、マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真である。

図 5 は、デコイ核酸の配列を示す図である。

図 6 は、滑膜細胞中のシノビオリンの発現抑制確認試験のタイムスケジュールを示す図である。

5 図 7 A は、RA 滑膜細胞におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真である。

図 7 B は、滑膜細胞中のシノビオリンの発現抑制を測定した WST-8 アッセイの結果を示す図である。

図 7 C は、滑膜細胞中のシノビオリンの発現をウエスタンブロッティングで確認した結果を示す写真である。

10 図 8 A は、ルシフェラーゼアッセイを行った結果を示す図である。

図 8 B は、デコイODNを利用してシノビオリンをノックダウンしたNIH3T3細胞におけるアポトーシスを示す写真及びウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

15 図 8 C は、RNAiを利用してシノビオリンをノックダウンしたNIH3T3細胞におけるアポトーシスを示す写真及びウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

図 9 A は、EBS-1 デコイ ODN によるシノビオリンの発現抑制を示す写真である。

20 図 9 B は、シノビオリンを過剰発現したNIH3T3細胞におけるEBS-1デコイODN処理によるアポトーシスを示す。

図 10 は、EBS-1デコイを用いた、RA滑膜細胞におけるシノビオリンRNAに対する抑制効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

25 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写調節領域をコードする部位に対するデコイ核酸を提供することを特徴とするものである。

1. 概要

本発明者は、シノビオリンを中心とした関節リウマチ病態解析を行っている。

最近、シノビオリンノックアウトマウスを用いた解析において、ER ストレスによるアポトーシス誘導の域値に ERAD の機能を担うシノビオリンの量が関与していることを見出した。

そこで、アポトーシス誘導の感受性を決定するシノビオリンの量を調節する転写機構を解明するためにプロモーター解析を行い、マウス細胞株及びマウス胚を用いてシノビオリンの構成的発現を担う Ets 結合部位 (EBS ; Ets binding site) を同定し、そのエレメントがインビボにおいてシノビオリンの発現に必須であることを証明した。Ets は、酵母からヒトまで保存されている転写因子である。Ets ドメインは、30 種類以上のファミリーを形成し、その多くが分化・増殖・アポトーシスを担う分子の転写活性を担っている (D.K.Watson and A.Seth,; Oncogene.review issue. Dec 18; 19(55) ; 2000)。また、NIH3T3 細胞において、その EBS を介し Ets ファミリーの一つ GABP α/β 複合体がその転写制御に関与していることを示した。

シノビオリンの発現は、ヘテロノックアウト (LacZ knock in mouse) の発現解析、ノーザン、ウエスタンによる解析によればユビキタスであり、多くの細胞においてシノビオリンの発現が必要とされていることが考えられる。このことは、シノビオリンノックアウトマウスが全身性のアポトーシス亢進にて胎生致死であることから推察される。但し、その発現には強弱があり、特に分泌能力の高い細胞 (膵臓、精巣、神経細胞) においてその発現が強い。このことは、一部の細胞においては、シノビオリンの発現が非常に高く要求されていると考えられる。

転写制御機構には、(i)基本転写複合体を含む構成的遺伝子発現と、(ii)ある刺激に対する誘導的遺伝子発現とがある。シノビオリンのプロモーターには TATA ボックス、イニシエーター配列が存在しない。このようなプロモーター構成の場合、SP1 や Ets ファミリー等の転写因子がその転写誘導において重要である (Rudge, Exp Cell Res. Mar 10;274(1):45-55. 2002)。

具体的な転写因子としては、GABP α 、GABP β 、GABP α と GABP β との複合体、Ets1、Tel、Fli-1 などが挙げられる。

GABP α は、Ets ドメインをもつ Ets ファミリーの一つであり、454 アミノ酸を有するタンパク質である。GABP α は、細胞においてユビキタスに発現し、

Ets ドメインを介し、GABP β とヘテロ 2 量体を形成する。さらに、GABP α は、2 つの Ets 結合部位を使用して、ヘテロ 4 量体を形成することが知られている。また、ターゲット遺伝子の転写制御においていくつかの特徴を有する。まず、GABP α は Ets ドメインによる DNA 結合能は有するが、転写活性化能は有しない。これに対し、GABP β は、DNA 結合能は有しないが、GABP α と 2 量体を形成することにより転写活性を誘導し、ヘテロ 4 量体を形成することによりさらに高い転写活性化能を発揮する (Yu M. J Biol Chem Nov 14; 272(46): 29060-7. 1997)。また、GABP α は、TATA ボックスを持たない遺伝子や、複数の転写開始点をもつ遺伝子の発現においてイニシエーターとして働くことができる (Yu M. J Biol Chem Nov 14; 272(46): 29060-7. 1997; Kamura T. J Biol Chem Apr 25; 272(17): 11361-8. 1997)。さらに、GABP α はその発現がユビキタスであるにも関わらず、他の部位に結合するパートナーの転写因子と相乗的に働くことにより、細胞特異的な分化・増殖に関与する遺伝子の発現を担う (Schaeffer L, EMBO J. Jun 1; 17(11): 3078-90. 1998)。

GABP β は Ets ファミリーではないが、382 アミノ酸を有する GABP α のコファクターであり、Ankyrin リピート配列を介し GABP α とヘテロ 2 量体を形成し、転写活性ドメインを有する。

Ets1 は、1983 年に鶏に赤芽球症を起こすレトロウイルス E26 の癌原遺伝子として発見された v-Ets のヒトホモログであり、441 アミノ酸を有するタンパク質である。

Tel は、452 アミノ酸を有するタンパク質であり、Ets ファミリーの中でも、転写抑制に働くことが報告されている。臨床的には、t (12;21) の染色体転座により AML1 と癒合遺伝子を形成し、白血病を起こすことが知られている。

Fli-1 は、452 アミノ酸からなり、t (11;22) 染色体転座により EWS と癒合遺伝子を形成し、ユーイング肉腫を起こすことが知られている。

Ets ファミリーは、酵母からヒトまで保存された Ets と呼ばれるドメインをもつ転写因子である。このドメインは、30 種類以上のファミリーを形成し、その多くが分化・増殖・アポトーシスを担う分子の転写活性を担っている (D.K. Watson and A. Seth,; Oncogene. review issue. Dec 18; 19(55); 2000)。

プロモーター領域を得るには、シノビオリン遺伝子又はマウスやヒトゲノム配列等から、制限酵素を用いて切り出す方法がある。しかしながら、一般的に都合のよい制限酵素部位が適切な位置に存在するとは限らないため、予め制限酵素認識部位を設けたプライマーを用いることにより、PCR で所望のプロモーター領域を増幅することにより得ることができる。また、既に判明しているプロモーター領域の塩基配列情報をもとにして、所望のプロモーター領域を化学合成することも可能である。このようにして、転写因子結合部位として EBS の他に ABS 及び SBS の存在が示唆される。実際に転写因子がその部位に結合するかどうかは、それぞれの部位を変異させ、その転写活性が低下することや、ゲルシフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay : EMSA) で解析して、転写因子が元来のプローブには結合するが、一塩基変異導入後では結合しないことを確認することにより判断する。

ここで、配列番号 1 にマウスシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を、配列番号 2 にヒトシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を例示する。

また、配列番号 8 にプロモーターコア領域である EBS-1 をコードする塩基配列を、配列番号 9 に ABS-1 をコードする塩基配列を、配列番号 10 に SBS-1 をコードする塩基配列を示す。

2. デコイ核酸

本発明は、上記転写因子に結合し、プロモーター活性を抑制することができるデコイ核酸（デコイオリゴヌクレオチド）である。本発明のデコイ核酸は、転写因子の結合部位を含む短いおとり核酸を意味し、この核酸を細胞内に導入し、転写因子がこの核酸に結合することにより、転写因子の本来のゲノム結合部位への結合が競合的に阻害され、その結果、その転写因子の発現が抑制されるような機能を有する。代表的には、デコイ核酸は核酸又はその類似体であり、標的結合配列に結合しうる核酸配列を少なくとも一つ含む。

本発明の好ましいデコイ核酸の例は、例えばプロモーターの EBS-1 に結合する転写因子と結合し得る核酸、プロモーターの ABS に結合する転写因子と結合し得る核酸、プロモーターの SBS-1 に結合する転写因子と結合し得る核酸、こ

これらの相補体を含むオリゴヌクレオチド、これらの変異体、又はこれらを分子内に含む核酸などが挙げられる。デコイ核酸は、上記 EBS-1、ABS 又は SBS-1 の配列をもとに、1 本鎖、又はその相補鎖を含む 2 本鎖として設計することができる。長さは特に限定されるものではなく、15～60 塩基、好ましくは 20～30 塩基である。

本発明においては、例えば EBS-1 に結合する転写因子と結合し得る核酸（配列番号 1 1）及び/又はその相補鎖（配列番号 1 2）をデコイ核酸として好ましく使用することができる。

核酸は、DNA でも RNA でもよく、またはその核酸内に修飾された核酸及び/又は擬核酸を含んでいてもよい。またこれらの核酸、その変異体、又はこれらを分子内に含む核酸は、1 本鎖又は 2 本鎖であってもよく、また環状でも線状でもよい。変異体とは、上記デコイ核酸配列の 1 又は数個（例えば 1 個～10 個、1 個～5 個又は 1 個～2 個等）の塩基が、欠失、置換又は付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能、すなわち、転写因子と結合する機能を有する核酸をいう。上記塩基配列を 1 つまたはそれ以上含む核酸であってもよい。

本発明で用いられるデコイ核酸は、当業界で公知の化学合成法又は生化学的合成法を用いて製造することができる。例えば、遺伝子組換え技術として一般的に用いられる DNA 合成装置を用いた核酸合成法を使用することができる。また、鋳型となる塩基配列を単離又は合成した後に、PCR 法又はクローニングベクターを用いた遺伝子増幅法を使用することもできる。さらに、これらの方法により得られた核酸を、制限酵素等を用いて切断し、DNA リガーゼを用いて結合することにより所望の核酸を製造してもよい。さらに、細胞内でより安定なデコイ核酸を得るために、塩基等にアルキル化、アシル化等の化学修飾を付加することができる。デコイ核酸の変異体の作製方法は、当業界で公知の方法を用いて、たとえば、部位特異的突然変異誘発法等によって合成することもできる。部位特異的突然変異誘発法は当分野において周知であり、市販のキット、例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super

Express Km 等（タカラバイオ社製））を使用することができる。などを用いることができる。

デコイ核酸を使用した場合のプロモーターの転写活性の解析は、一般的に行なわれるルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、CAT アッセイ、アポトーシスの特異的マーカーであるアネキシンVを用いた染色方法、ウェスタンブロッティング法、FACS 解析法、RT-PCR 等を採用することができる。これらのアッセイを行なうためのキットも市販されている（例えば promega dual luciferase assay kit）。

例えばルシフェラーゼアッセイの場合は、目的遺伝子の転写開始点の上流にレポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結する。また、アッセイの対象となる細胞間の導入効率を補正するために、サイトメガロウイルス（CMV） β ガラクトシダーゼ（ β -gal）遺伝子をレポーターとしてプロモーターの下流につないだベクターを細胞に同時に導入してもよい。細胞への導入は、例えばリン酸カルシウム法等を採用することができる。ベクターを導入した細胞は所定時間培養した後、回収し、凍結－融解等によって細胞を破壊した後、一定量の細胞抽出液を用いてルシフェラーゼ及び β -gal 活性を測定する。

これらの解析により、デコイ核酸を使用した場合には、シノビオリンの転写活性が阻害され、滑膜細胞、癌細胞などのアポトーシスが誘導されることが示される。

3. デコイ核酸を含む医薬組成物

本発明は、上記のデコイ核酸を1又はそれ以上含む、シノビオリン遺伝子の発現に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物に関する。本発明のデコイ核酸は、標的結合配列への結合活性を有する限り、本発明の医薬組成物として用いられる。

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、関節リウマチ、線維症、癌及び脳神経疾患などの細胞増殖性疾患及び/又は脳神経疾患が挙げられる。本発明の医薬組成物を疾患に適用するにあたり、上記疾患は単独の場合であっても複数の疾患が併発した場合であってもよい。

本発明の医薬組成物を癌の治療剤として使用する場合は、癌の種類は特に限定

されず、脳腫瘍、舌癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆道癌、胆嚢癌、十二指腸癌、大腸癌、肝癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、皮膚癌、各種白血病（例えば急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型 T 細胞白血病、悪性リンパ腫）等を対象として適用される。

上記癌は、原発巣であっても、転移したものであっても、他の疾患と併発したものであってもよい。

脳神経系疾患としては、例えばアルツハイマー、パーキンソン病、ポリグルタミン病が挙げられる。

10 本発明の医学的組成物は、デコイが患部の細胞内または目的とする組織の細胞内に取り込まれるような形態で用いられる。

本発明のデコイ核酸を含有する医薬組成物の投与形態は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。経口投与の場合は、適当な剤型、例えば錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物により投与が可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に直接的又は間接的に患部に投与することができる。

20 本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

25 また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。本発明の医薬組成物を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等から全身投与する。脳等に局所投与することもできる。本発

明の医薬組成物を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。リポソーム構造を形成するための脂質としては、リン脂質、コレステロール類や窒素脂質等が用いられるが、一般に、リン脂質が好適であり、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイルノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン等の天然リン脂質、あるいはこれらを定法に従って水素添加したものが挙げられる。また、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン等の合成リン脂質を用いることができる。

リポソームの製造方法は、デコイが保持されるものであれば特に限定されるものではなく、慣用の方法、例えば、逆相蒸発法(Szoka, F ら、*Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 601 559 (1980))、エーテル注入法(Deamer, D.W.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol.308 250 (1978))、界面活性剤法(Brunner, J ら:*Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 455 322 (1976))等を用いて製造できる。

これらのリン脂質を含む脂質類は単独で用いることができるが、2種以上を併用することも可能である。このとき、エタノールアミンやコリン等の陽性基をもつ原子団を分子内に有するものを用いることにより、電氣的に陰性のデコイ核酸の結合率を増加させることもできる。これらリポソーム形成時の主要リン脂質の他に一般にリポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール類、ステアリルアミン、 α -トコフェロール等の添加剤を用いることもできる。このようにして得られるリポソームには、患部の細胞又は目的とする組織の細胞内への取り込みを促進するために、膜融合促進物質、例えば、センダイウイルス、不活化センダイウイルス、センダイウイルスから精製された膜融合促進タンパク質、ポリエチレングルコール等を添加することができる。

本発明の医薬組成物は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許

容されるキャリアを含むものであってもよい。このようなキャリアは添加物であってよく、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、
5 水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容さ
10 れる界面活性剤等が挙げられる。

上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製されたデコイ核酸を溶剤(例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等)に溶解し、これに Tween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用す
15 ることができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば以下のものが挙げられる。すなわち、マンニトール、ブドウ糖、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール等の糖類、トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモまたは他の植物由来のデンプン等のデンプン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル
20 セルロース又はカルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース、アラビアゴム、トラガカントゴム等のゴム、ゼラチン、コラーゲン等などである。

所望により、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸又はその塩(例えば、アルギン酸ナトリウム)等の崩壊剤又は可溶化剤を使用することができる。

25 本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なる。投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、疾患の徴候又は状態を軽減するデコイ核酸の量である。このような核酸の治療効果及び毒性は、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的手順、例えば ED50(集団の 50%において治療的に有効な用量)、あるいは LD50(集団の

50%に対して致死性である用量)によって決定され得る。

治療効果と毒性効果との間の用量比は治療係数であり、ED50/LD50 として表され得る。本発明の医薬組成物の投与量は、例えば1回につき体重 1 kg あたり 0.1 μ g~100 mg、好ましくは 1~10 μ g である。但し、上記治療剤はこれら
5 の投与量に制限されるものではない。アデノウイルスを投与する場合の投与量は、1 日 1 回あたり $10^6 \sim 10^{13}$ 個程度であり、1 週~8 週間隔で投与される。但し、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

10

〔実施例 1〕

本実施例は、シノビオリンプロモーターの作製のためのプラスミド構築に関する実施例である。

マウス(C57Bl/6 系)のゲノムより、シノビオリン遺伝子を含む 5' から 3' ま
15 で約 7.5 k のゲノムを SyB/pBluescript にサブクローニングした。その後、シノビオリン遺伝子のプロモーター領域を XhoI と NcoI で処理し、約 2.2 k の断片を抜き出し、PGV-B2(TOYO INK GROUP 社)の中に挿入した(SyG-2.2 k)。この約 2.2 k の断片を全長プロモーターとした(配列番号 1)。さらに、全長プロ
20 モーターの 5' 側から一部の領域を削除し、プロモーター領域を短くしたコンストラクトを作製した。作製したプロモーターをまとめると表 1 の通りである。

25

表 1 作製したプロモーター一覧表 (マウス)

名 称	領 域*	配列番号 1 に示す塩基配列の領域
-2201/+843 (全長)	TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に 2201 塩基、下流(3'側)に 843 塩基の領域	1~3043
-1233/+843	TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 843 塩基の領域	969~3043
-1060/+843	TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 843 塩基の領域	1142~3043
-503/+843	TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 843 塩基の領域	1699~3043
-322/+843	TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 843 塩基の領域	1880~3043
-200/+843	TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 843 塩基の領域	2002~3043
-108/+843	TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 843 塩基の領域	2094~3043
-84/+843	TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 843 塩基の領域	2118~3043
-73/+843	TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 843 塩基の領域	2129~3043
-65/+843	TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 843 塩基の領域	2137~3043
-39/+843	TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 843 塩基の領域	2163~3043
-10/+843	TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 843 塩基の領域	2191~3043

領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基を-1 として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を+1 として数える。

- 5 なお、ヒトのシノピオリン遺伝子の切断型プロモーターも、マウスの場合と同様に作成することができる (配列番号 2)。この場合の切断部位の位置を表 2 に示す。

表2 作製したプロモーター一覧表 (ヒト)

名 称	領 域*	配列番号 2 に示す塩基配列の領域
-2201/+892 (全長)	TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に 2201 塩基、下流(3'側)に 892 塩基の領域	1~3092
-1233/+892	TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 892 塩基の領域	969~3092
-1060/+892	TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 892 塩基の領域	1142~3092
-503/+892	TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 892 塩基の領域	1699~3092
-322/+892	TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 892 塩基の領域	1880~3092
-200/+892	TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 892 塩基の領域	2002~3092
-108/+892	TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 892 塩基の領域	2094~3092
-84/+892	TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 892 塩基の領域	2118~3092
-73/+892	TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 892 塩基の領域	2129~3092
-65/+892	TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 892 塩基の領域	2137~3092
-39/+892	TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 892 塩基の領域	2163~3092
-10/+892	TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 892 塩基の領域	2191~3092

* 領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基を-1として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を+1として数える。

5 次に上記マウス由来プロモーターの変異体を作製するため、オーバーラップ伸長による部位特異的変異誘発法(Molecular cloning, CSHL Press, 3rd edition, 2001 年, chapter 13) を用いて SyG-2.2 kG-76T/BV2 を作製した。使用したプライマーを以下に示す。

1. EBS-1m(G-76T): GCGCCGCCGTAAGTGAGGT (配列番号 3)

10 2. ABSm(G-68T): AAGTGAGTTGTCTTACCCCC (配列番号 4)

3. SBS-1m(G-92A,C-91A): ACTCCGCCAAGCCCCGCGCC (配列番号 5)

PCR は、反応液 50 μ l 中、1 pmol SyB/pBluescript、100 pmol プライマー、0.2 mM dNTPs、5 U ポリメラーゼ、10 mM Tris-HCl(pH8.3)及び 50 mM KCl を含む反応組成液を用いて、以下の PCR 条件で行なった。

5 PCR 条件

第一段階：94 $^{\circ}$ C、1 分 \rightarrow (94 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、1 分) \times 25 回

第二段階：1 サイクル目：94 $^{\circ}$ C、1 分 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow 29 分かけて 30 $^{\circ}$ C まで冷やす \rightarrow 30 $^{\circ}$ C、1 分 \rightarrow 9 分かけて 72 $^{\circ}$ C に \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、1 分 \rightarrow (94 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、1 分) \times 25 回

EBS-1m(G-76T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2125 番目 (TS から上流に向かって 76 番目(-76)) の G を T に変異させるためのプライマーであり、ABSm(G-68T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2133 番目 (TS から上流に向かつて 68 番目(-68)) の G を T に変異させるためのプライマーであり、SBS-1m(G-92A,C-91A)は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2112 番目 (TS から 91 番目) の C を A に、かつ、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2111 番目 (TS から 92 番目) の G を A に変異させるためのプライマーである。

20 [実施例 2]

本実施例は、シノビオリンプロモーターの機能解析に関する実施例である。

シノビオリンの量の調節機構を解明するために、プロモーター解析を行った。なお、シノビオリンは、トランスジェニックマウス(LacZ knock in)の解析、並びにノーザン及びウエスタンの結果よりユビキタスに発現していることがわかって

まず、シノビオリン プロモーターのクローニング後、翻訳開始点より 2.2 k を含む領域をルシフェラーゼベクターに結合させた。様々な細胞(下記)を用いて、上流側から削ったコンストラクションにてその転写活性を調べた。なお、細胞は、10%不活化ウシ胎児血清添加 DMEM 培地(Life Technologies, Inc.)を用いて培養

した。

使用した細胞

ATDC5：マウス teratocarcinoma 細胞 AT805 由来の垂株。軟骨および色素細胞特異的。アルカリフォスファターゼ陽性。

5 HEK293：ヒト胎児腎臓由来細胞

NIH3T3：マウス胎仔由来線維芽細胞

トランスフェクションとレポーターアッセイは以下の通り行なった。

細胞を 2×10^4 /ウェルにて 24 ウェルプレートに準備した。その 24 時間後、FUGENE 6 キットを使用し、キット(Biochem. Roche 社)のマニュアルに従って
10 発現した。

またトランスフェクション効率の補正のため、CMV- β -gal を各 50 ng 使用し、さらに全ベクターのみを入れて全量を 200 ng にそろえた。

トランスフェクション後 30 時間でタンパク質を回収した。まず、培地を捨てた後、PBS で洗い、Passive lysis buffer™ (Promega 社)を 100 μ l 用いて細胞
15 溶解物を回収した。次にその細胞溶解物の 20 μ l を 96 ウェルプレートに移した後、ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、 β -gal 活性をプレートリーダーにて測定した後、 β -gal 値で Luc 値を割り補正した。なお、 β -gal 染色は以下のとおり行なった。すなわち、 β -ガラクトシダーゼは X-gal を用い、染色した (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド
20 Sigma 社)。胚を 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、X-gal 溶液に浸した後、37 °C で 12 時間～24 時間染色した。染色後、PBS で洗浄し、再度 4% パラホルムアルデヒドで固定した。

その結果、-84 から -73 bp の 12 塩基においてその転写活性が 10% から 30% に低下した (図 1 A、B)。

25 その領域を含む -114 から -1 においては、マウスとヒトで 94% の相同性を有し、さらに 12 塩基においては、100% の相同性であった。コンピュータを用いたバイオインフォマティクス解析ソフト (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>)にて解析を行った結果、その 12 塩基に EBS(Ets 結合部位)が存在することが判明した(図 1C)。

次に本発明者は、その領域を含む前後の領域における転写因子結合配列に変異を導入し、いくつかの細胞系を用いて、その部位の転写に及ぼす影響について検討した。

- 5 図 1D にみられるように EBS の点変異により、ほぼすべての細胞系にてその活性が約 9% から 40% 程度に低下した。これらのことから、この EBS は、シノビオリンの構成的発現を担う必須の要素であると考えられた（以後 EBS-1 とする）。

〔実施例 3〕

- 10 本実施例は、EBS-1(-89 から -65) に結合する転写因子を同定したものである。

Ets ファミリーは 30 種類以上のファミリーを形成し、すべて DNA 結合ドメインである Ets ドメインを有する。またその中心配列は GGAA であり、その配列への結合にはその配列に続く配列が重要であると考えられている。

- 15 まず、その 12 塩基配列を含んだプローブを使用し、実際にその配列に転写因子が結合するかどうか検討した。この転写因子の結合試験は、ゲルシフトアッセイ(EMSA)により行った。

EMSA は以下の通り行った。

プローブ

EBS-1 WT (-89 から -65): CCCC GCGCCG CCGGAAGTGT (配列番号 6)

- 20 EBS-1 MT (-89 から -65): CCCC GCGCCG CCGTAAGTGT (配列番号 7)

EMSA 用のプローブは、25 塩基配列のセンス鎖とアンチセンス鎖を 90℃ で 10 分アニーリングさせることにより作製した。

- 25 次に、T4 ヌクレアーゼキナーゼ、バッファーおよび γ - ^{32}P を混合し、混合液を室温で 30 分反応させた。反応液を MicroSpin G-25 カラム (Amersham Pharmacia Biotech 社) に通し、採取されたカラムのフラクションを遠心にて分離し、標識したプローブを得た。放射活性は 1 μl あたり 30000 cpm 以上のものを使用した。

10 μg のタンパク質、反応バッファー及びプローブを混ぜ、室温で 30 分反応

させた。スーパーシフトの場合は、プローブと反応させる前に 1 時間 4℃で反応させた。その反応液を非変性ゲルにて 100 v、50 mA で 3 時間程度泳動させた。ゲルを乾燥させた後、Fuji BAS2000 を用いオートラジオグラフィーにて解析した。

5 その結果、NIH3T3 の核抽出液を使用したゲルシフトにより、4 つのバンド (図 2A の a、b、c、d の位置のバンド) が形成されることが判明した。さらに cold competition (標識していないプローブを用いた競合試験) により、そのすべてのバンドが消失し、1 塩基変異を入れたプローブにおいてはその阻害が見られなかった (図 2A)。

10 次に、どの Ets ファミリーが結合するかを検討するため、Ets1/Pea3、Ets プローブの cold competition を行ったところ、Ets1/Pea3 のプローブで競合阻害され、その変異によりその阻害が消失した (図 2B、5 と 6 番のレーン)。

このことは、Ets1/Pea3 プローブ (Santa Cruz 社) に結合する因子である Ets 1、Pea 3、GABP α 等の転写因子である可能性が考えられた。さらにさまざまな抗体を使用して、スーパーシフト試験を行ったところ、GABP α と Tel がスーパーシフトし、Fli-1 は阻害効果を示した (図 2B の 5、6 番のレーン、図 2C の 6、7、8 と 10、11、12 番のレーン)。また、GABP α 、Fli-1、Ets1 のインビトロ翻訳産物でゲルシフト試験を行ったところ、そのすべてにスーパーシフトが見られた。これらのことから、この配列には複数の Ets ファミリーが結合することが示された。

15

20

次に、スーパーシフトした GABP α による GABP β との複合体形成について検討を行なった。それぞれインビトロ翻訳産物を用い、ゲルシフト試験を行ったところ、GABP α タンパク質に GABP β タンパク質を加えたレーン 7 において、新たなバンド a、b (複合体) の形成が認められた (図 2D)。さらに、GABP α 抗体を加えるとその複合体 a、b が消失しスーパーシフトした (図 2D、レーン 8、9)。また GABP β 抗体を加えたところ、複合体 a の形成が阻害された (図 2D、レーン 10、11)。

25

これらのことから、GABP α/β は、シノビオリン プロモーターの EBS-1 にて複合体を形成することがわかった (図 2D)。

〔実施例 4〕

本実施例は、NIH3T3 における Ets ファミリーによる転写制御および GABP α と Fli-1、Ets1 のシノビオリン転写活性に対する効果を確認したものである。

それぞれ EBS-1 に結合する転写因子の細胞内でのシノビオリンの転写活性化能を評価するため、転写活性化アッセイを行った。

(1) ODN のオリゴ作製と細胞抽出液の作製

20 ヌクレオチド長のオリゴデオキシリボヌクレオチド(ODN)は化学合成により得た。decoy(デコイ)ODN はセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドのアニーリングにより作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-ウェルプレート(1×10^3 細胞/ウェル)に移した。24 時間後、1 ウェルあたり 20 pmol のデコイ ODN をウェルに入れ、LipofectAMINE(Invitrogen 社、San Diego, CA)を用いてキットの説明書に従って3日間トランスフェクションを行った。デコイ ODN を有する細胞の増殖を決定するために、Alamar Blue(Biosource International 社)を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った。

(2) RNAi のオリゴ作製と細胞抽出液の作製

21 ヌクレオチド長の RNA は化学合成により得た。siRNA は Elbashir らのプロトコル (Elbashir, S.M., Nature 411: 494-498. 2001) に従って作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-ウェルプレート(1×10^3 細胞/ウェル)に移した。24 時間後、1 ウェルあたり 20 pmol の siRNA をウェルに入れ、LipofectAMINE (Invitrogen 社、San Diego, CA)を用いてキットの説明書に従って3日間トランスフェクションを行った。siRNA 細胞の増殖を決定するために、Alamar Blue (Biosource International 社)を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った(図 7B)。

(3) 結果

NIH3T3 において、Fli-1 はシノビオリン転写活性を抑制し、GABP α はその転写活性を増加させる結果が得られた (図 3A、B)。また、GABP α 、GABP β の RNAi にてノックアウトした NIH3T3 細胞では、シノビオリンの転写も低下

が認められた（図 3C）。これらのことから NIH3T3 において、GABP α/β 複合体がシノビオリンの発現を担っていることが考えられた。

さらに、その GABP α/β 複合体が EBS-1 を介してシノビオリンの転写活性を担っていることを証明するため、EBS-1(G-76T)変異体および EBS-1 野生型の有するプロモーター(-200 から+843)を使用し転写活性アッセイを行った。

その結果、変異体が全く活性化されないにもかかわらず、野生型では約 3 倍の転写活性化がみられた。

(4)ウエスタンブロッティング

最後に NIH3T3 を 200 nM のデコイで処理した後、シノビオリンの発現をウエスタンブロッティングにて評価した。

ウエスタンブロッティング解析は以下の通り行った。すなわち、細胞培養物を回収し、1% NP-40、25 mM Tris-HCl、pH 6.8、0.25% SDS、0.05% 2-メルカプトエタノール及び 0.1%グリセロールを含む溶液中で溶解させた。透明な細胞溶解物のアリコート SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離したタンパク質をニトロセルロース膜に移し、抗シノビオリンモノクローナル抗体を用いてイムノブロットを行った。結合した抗体を、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン及び ECL 検出システム(Amersham Pharmacia Biotech 社)により検出した。

その結果、EBS-1 野生型で処理したシノビオリンの発現は約半分に低下した。

これらのデータから GABP α/β により EBS-1 を介して、シノビオリンの転写が制御されていることが示された。

〔実施例 5〕

本実施例は、マウス胚におけるシノビオリンの発現に必須の部位の同定に関するものである。

次に、マウスの胚においてインビボにおける EBS-1 の効果を確認するため、シノビオリンプロモーターに LacZ を結合したプラスミドを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。Tg は全長 2.2 k と 1 k のプロモーターとそれぞれ 1 塩基変異を入れたプロモーターを過剰発現させた 4 種類を作製した（図

4A)。

トランスジェニック(Tg)マウス用のコンストラクションと Tg マウスの作製は以下の通り行なった。

- 5 SyG-2.2k/BV2 から NotI と NcoI で約 2.2 k の断片を抜き出した後、
SyTB/pBluescript へ挿入し、SyL-2.2kwt/Bluescript を作製した。さらに、
SyL-2.2kmG-76T/pbs 、 SyL-200wt/pBluescript 及 び SyL-200mG-
76T/pBluescript を、それぞれ SyG より取り出した断片を用いて作製した。各
構築物について、それぞれ QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN 社)を使用し精製後、
10 ScaI にて線状化した DNA を BDF マウス(C57BL/6N と DBA/2N の交配による
仔マウス)の受精卵の核内に直接マイクロインジェクションし、仮親の卵管に移
植した。それぞれ、8 から 9 母胎より誕生したマウスの尾からゲノムを抽出し、
サザンブロット法にて Tg マウスであることの確認を行った。

- これらの Tg マウスからシノビオリンの発現を検討するため、胚による X-gal
染色を行った。その LacZ をノックインしたノックアウトマウスの胚における
15 LacZ の発現と今回作製した 4 つの Tg マウスの発現を比較検討した。

- シノビオリンの 11.5 から 14.5 d.p.c(days post coitus : 胎齢)の胚を使用し、
LacZ 染色を行った。2.2 k と 1 k のプロモーターを導入したトランスジェニック
マウスは、ヘテロノックアウトマウスとほぼ同じ部位に染色がみられた。驚いた
ことに、1 塩基変異を導入した 2.2 k と 1 k のプロモーターを導入したトランス
20 ジェニックマウスは、そのどちらも発現部位がその系によりランダムになること
が確認された (図 4B)。

転写活性化に必要な領域がなくなると、上記結果と同様の結果が得られること
が報告されている(pax5、coll1a2 等)。これらのことから、EBS-1 は、シノビオ
リンの転写に必須の部位であることが判明した。

- 25 さらに、その発現と GABP α の発現を 13.5 d.p.c の胚を用いて比較したところ、
ほぼ同様の部位に発現していることが判明した(図 4C)。以上の結果より、胚発
生においても、インビトロの結果と同様、GABP α が EBS-1 を介してシノビオ
リンの発現を制御していることが示された。

〔実施例 6〕

本実施例は、RA 滑膜細胞におけるシノビオリンの発現抑制を確認したものである。

5 関節リウマチの滑膜細胞における EBS-1 を介した GABP α の効果について検討を行ったところ、滑膜細胞の核抽出液を用いたゲルシフトにおいても、NIH3T3 の各抽出液のときと同様に GABP α にてスーパーシフトが得られた。さらにその EBS-1 のリウマチ滑膜細胞における意義、すなわち GABP α による EBS-1 を介した転写制御がシノビオリンの発現抑制につながり、最終的に滑膜細胞の増殖抑制となるかことを確認するため、EBS-1 デコイによるシノビオリ
10 ンの発現抑制について検討した。

まず、上記の EBS-1 に結合する GABP α と結合するデコイ核酸（配列番号 11、12）およびネガティブコントロールのデコイ核酸（配列番号 13、14）も設計した（図 5）。20 ヌクレオチド長の ODN は化学合成により得た。デコイ ODN はセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドのアニーリングにより作製した。

15 以下のように、デコイ核酸を細胞に導入した。すなわち、対数増殖期のヒトリウマチ滑膜細胞をトリプシン処理し、10%FCS を含む DMEM にて 96 ウェルプレートに 1.0×10^3 細胞/ウェルで培養した。18~24 時間後、FCS 無し、抗生物質無しの DMEM で一度洗浄し、FCS 無し、抗生物質無しの DMEM 90 μ L を添加した。OPTI-MEM I Reduced-Serum Medium 45 μ L、上記のデコイ ODN(20
20 μ M)5 μ L を混ぜたものを OPTI-MEM I Reduced-Serum Medium 50 μ L、Lipofectamine 2000 1 μ L を混ぜたものに加え、弱くピペッティングした後 10 分間放置した。これを細胞に 10 μ L ずつまんべんなく添加した。24 時間培養後、FCS を 10 μ L 加え、軽くかき混ぜて放置して 3 日間トランスフェクションを行った（図 6）。この細胞を用いてキットの説明書に従って細胞増殖アッセイに供
25 した。

HRP 活性の検出には ECL Plus キット(Amersham 社)を用いた。

その結果、約半分にその発現の低下が認められた（図 7 A）。

上記の細胞を 24 時間培養後、WST-8 アッセイに供するとともに、この 24 時間後細胞破碎液にて細胞を溶解し、ウエスタンブロッティングを行った。WST-

8 アッセイは Cell Counting Kit-8(Dojindo 社)を用いて上記 24 時間培養後の細胞に Cell Counting Kit-8(Dojindo 社、WST-8)を添加し、4 時間後の吸光度(450 nm)を測定して行った。ウエスタンブロッティングは、細胞破碎液 15 mM Tris(pH 7.5)、200 mM NaCl、0.5% NP40、0.1% SDS、1 mM PMSF、2 μ g/mL リューペプチン(leupeptin)、2 μ g/mL アプロチニン(aprotinin)、2 μ g/mL ペプスタチン(pepstatin)にて調製後、SDS-PAGE により分離し、エレクトロブロッティング法によりニトロセルロース (NC) 膜に転写した。この NC 膜に対し、5%スキムミルクを加えた 0.03 %Tween 20 添加 TBS で室温、1 時間ブロッキングした後、抗シノビオリン抗体又は抗 β アクチン抗体を 0.5%スキムミルクを加えた 0.03% Tween20 添加 TBS で室温、1 時間免疫反応させた。反応後の NC 膜を 0.03% Tween 20/TBS で洗浄し、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を 2 次抗体として、室温、1 時間免疫反応させ、0.03% Tween 20/TBS で洗浄し、HRP 活性を検出することにより目的抗原を検出した。

WST-8 アッセイの結果を図 7 B に、ウエスタンブロッティングの結果を図 7 C に示す。図 7 B に示すとおり、スクランブルデコイ核酸導入細胞(ネガティブコントロール)に比べ、EBS-1 デコイ核酸導入細胞では優位に細胞増殖活性が抑制されており、図 7 C に見られるとおり、ウエスタンブロッティングにおいてもシノビオリンタンパク質生成量の減少が見られた。

以上の結果から、RA 滑膜細胞において、上記デコイ核酸を用いるとプロモーター活性が抑制されることが示された。

〔実施例 7〕

本実施例は、シノビオリン発現における EBS-1 の機能的な効果を確認したものである。

(1) ルシフェラーゼアッセイ

シノビオリン発現における EBS-1 の機能的な効果の検討を行った。まず、EBS-1(77-72)を標的とするデコイ ODN(以下、『EBS-1 デコイ』という)を合成し、この EBS-1 デコイを NIH3T3 細胞に導入することにより、シノビオリンの調節における EBS-1 デコイの効果をルシフェラーゼアッセイにより確認した。

FITC を用いた免疫化学分析により、NIH3T3 細胞に導入された EBS-1 デコイの効果は 80% 以上であることを確認してからアッセイを行った。

NIH3T3 細胞への一過性トランスフェクションを行うため、試料プラスミド (100 ng) 及び内在コントロール DNA (CMV- β -ガラクトシダーゼ発現ベクター 50 ng) を FUGENE6™ (Roche 社) を用いて、マニュアル (Roche 社) に従ってトランスフェクションして、24 ウェルプレートに添加した。30 時間培養後、培養液を吸引し、PBS で洗い、細胞に Passive lysis buffer™ (Promega 社) を 100 μ L を加えた。その細胞溶解物の残渣をペレットとして沈殿させ、上清を回収し、すぐにルシフェラーゼ活性及び β -gal 活性を測定した。細胞抽出物中のルシフェラーゼ活性を測定するために、細胞溶解液 20 μ L をアッセイバッファ (0.25 mM ATP、10 mM $MgCl_2$ 、100 mM リン酸カリウム、pH 7.8) 100 μ L に添加した。発光は MicoLumat Plus (Perkin Elmer-Cetus 社) で測定した。 β -gal アッセイは以下のとおり行った。すなわち、細胞抽出物 7 μ L にアッセイバッファ (60 mM Na_2HPO_4 、40 mM NaH_2PO_4 、1 mM $MgCl_2$ 、50 mM β -メルカプトエタノール、0.665 mg/ml σ -ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド) を 100 μ L 加えた後、37°C で 30 分間インキュベーションした。1.0 M Na_2CO_3 を 160 μ L 加えて反応を停止させて、420 nm で吸光度を測定した。ルシフェラーゼ測定値は全て、プラスミド CMV- β -ガラクトシダーゼで発現した β -ガラクトシダーゼに対するトランスフェクション効率で標準化 (補正) し、得られた値を相対ルシフェラーゼ活性とした。さらに、これらの値を SyG-200/+843 に対して相対化し、平均を求めた。

その結果、EBS-1 デコイを導入した細胞の抽出物を用いたルシフェラーゼアッセイでは、トランスフェクション試薬のみの場合と比べて、EBS-1 デコイでは、28.4% まで低下しており、それにより、転写が抑制された (図 8A) ことが示された。

(2) アネキシン V による染色

NIH3T3 細胞をトリプシン処理し、冷 PBS で 2 回洗浄し、1 \times アネキシン結合バッファ (Vybrant apoptosis assay kit, Invitrogen 社) に懸濁し、1 $\times 10^6$ 細胞/ml の濃度となるように調製した。1 試験あたり、細胞懸濁液 100 μ l を使用した。5

μg の FITC 標識 アネキシン V および $1\mu\text{l}$ の PI 検量線用溶液を加え、室温で 15 分間インキュベートした後、 $400\mu\text{l}$ の $1\times$ アネキシン結合バッファを加え、よく攪拌した後、FACSCalibur(Becton Dickinson 社)により解析を行なった。

また、シノビオリンは ER ストレスにより誘導されるアポトーシスに抵抗性を有することから、シノビオリンの量とアポトーシスの関係を明らかにするために以下の実験を行なった。

NIH3T3 細胞を調製し、24 時間後に GFP 又はシノビオリンの siRNA(25 nM) を、LIPOFECTAMINE 2000(Invitrogen 社)を用いて NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、84 時間インキュベートした。また、上記と同様にして EBS-1
10 デコイ ODN を作製し、これを NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。

その結果、EBS-1 デコイ核酸を用いてシノビオリンの転写阻害による影響をみたところ、NIH3T3 細胞においてアポトーシスが誘導された (図 8 B)。図 8 B において、上パネルはウエスタンブロッティングの結果を示し、下パネルは NIH3T3 細胞の顕微鏡写真である($100\times$)。同様に、NIH3T3 細胞において、シ
15 ノビオリンの RNAi によりシノビオリンの発現量を低下させたところ、アポトーシスが誘導された (図 8 C)。図 8 C において、上パネルはウエスタンブロッティングの結果を示し、下パネルは NIH3T3 細胞の顕微鏡写真である($100\times$)。

(3) FACS 解析

さらに、シノビオリンを過剰発現する NIH3T3 細胞を作製し、EBS-1 デコイ
20 核酸による影響を検討した。

シノビオリンを過剰発現する安定細胞株の樹立については、LIPOFECTAMINE 2000(Invitrogen 社)による NIH3T3 細胞へのトランスフェクションから 24 時間後、細胞を新鮮増殖培地で 10 倍希釈して継代した。翌日、選択培地(G418 を $0.5\mu\text{g/ml}$ 含有)を添加し、HA-Synoviolin-HAHA/pcDNA3 発現ベクターを安定
25 発現するクローンを得た。なお、対照として又は HA-pcDNA3 空ベクターを使用した。各細胞株においてプラスミドからの発現を確認するため、HA タグに対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

EBS-1 デコイ ODN によるアポトーシス誘導については、次の通り実験を行った。

FUGENE6TM (Roche 社)試薬による EBS-1 デコイのトランスフェクションを行って 84 時間後に、細胞を回収してマイクロチューブに入れ、アネキシン V-FITC でラベルした。FACS 分析により、生細胞とアポトーシスを起こした細胞との分布状態を測定した。さらに、シノビオリン抗体を用いたウエスタンブロッティングも行った。なお、対照として β -アクチン抗体を使用し、安定発現の確認として HA-抗体を使用した。

結果を図 9 A 及び図 9 B に示す。シノビオリン過剰発現細胞では、EBS-1 デコイによるアポトーシスに対する抵抗性が獲得された (図 9 A、図 9 B)。加えて、アネキシン V を用いた FACS によるアポトーシスの定量化を行なったところ、通常の NIH3T3 細胞においては 51.1%がアポトーシスを起こしていたが、シノビオリン過剰発現細胞では、その割合が 29.8%であった (図 9 B)。図 9 B のスクランブルと EBS-1 デコイのパネルのうち、左側の写真は、100 倍の倍率による NIH3T3 細胞の顕微鏡写真である。

以上のことから、EBS-1 を介して転写調節を抑制すると、シノビオリンの発現が抑制され、NIH3T3 細胞のアポトーシスが誘導されることが示された。

〔実施例 8〕

本実施例は、EBS-1 デコイがシノビオリン RNA の発現を抑制することを、リアルタイム PCR により確認したものである。

対数増殖期のヒトリウマチ滑膜細胞(RASCs)をトリプシン処理し、10%FCS を含む DMEM にて 6 ウェルプレートに 1.5×10^4 細胞/ウェルで培養した。18~24 時間後、FCS 有り、抗生物質無しの DMEM で一度洗浄し、FCS 無し、抗生物質無しの DMEM 1000 μ L を添加した。OPTI-MEM I Reduced-Serum Medium 47.5 μ L、上記の EBS-1 デコイ ODN(final 100 μ M)2.5 μ l、あるいはシノビオリン siRNA(final 20 μ M)2.5 μ l を混合したものを OPTI-MEM I Reduced-Serum Medium 49 μ L、Lipofectamine 2000 1 μ L の混合物に加え、弱くピペッティングした後 10 分間放置した。これを細胞に 100 μ L ずつまんべんなく添加した。24 時間培養後、軽くかき混ぜて放置し、以下の方法により、トランスフェクションを行った。

トランスフェクション試薬添加 84 時間後、細胞から Isogene(ニッポンジーン社)を用いたフェノール抽出法で全 RNA を抽出し、RT(real time)-PCR を行った。

試薬は TaqMan Universal PCR Master Mix (Roche 社)及び Applied Biosystems 社より購入した以下のプローブを用いた。

5 シノビオリン : HS00381211_m1 HRD1

hsGAPDH : Human GAPDH

すなわちプローブ 0.5 μ L、RNA 1 μ L、TaqMan Universal PCR Master Mix 5 μ L、精製水 3.5 μ L を PCR チューブに分注後混合し、アプライドバイオ RT-PCR 7500 を用いて RT-PCR を行った。

10 サイクルは、cDNA 伸長反応として 50 $^{\circ}$ C 2 分、 95 $^{\circ}$ C 10 分を 1 回、続けて PCR 増幅反応として 95 $^{\circ}$ C 15 秒、 60 $^{\circ}$ C 1 分を 50 回行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 5 分最終伸長反応を行った後 4 $^{\circ}$ C で保存した。

RNA 量発現の解析はリアルタイム PCR 装置付属の解析ソフトを用いて行った。

シノビオリン遺伝子発現量は hsGAPDH の発現量で割ることにより値を補正した。

15

その結果、EBS-1デコイを用いた場合、シノビオリン RNA の発現が抑制されたことが明らかとなった (図 10)。

産業上の利用可能性

20 本発明により、シノビオリン遺伝子のプロモーターに関するデコイ核酸が提供される。本発明のデコイ核酸は、シノビオリンの転写因子結合部位において、この転写因子と競合的に結合することができ、その結果、シノビオリンプロモーターの活性を抑えることができる。このことは、本発明のデコイ核酸がリウマチ等の各種疾患の治療に有用であることを意味する。

25

配列表フリーテキスト

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 合成 DNA

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 1 1 : 合成 DNA

配列番号 1 2 : 合成 DNA

5 配列番号 1 3 : 合成 DNA

配列番号 1 4 : 合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合してプロモーター活性を阻害することができるデコイ核酸。
- 5 2. 以下の (a) 又は (b) のデコイ核酸。
 - (a) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列からなるデコイ核酸
 - (b) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸
- 10 3. 以下の (a) 又は (b) のデコイ核酸。
 - (a) 配列番号 1 1 及び 1 2 に示される塩基配列からなるデコイ核酸
 - (b) 配列番号 1 1 及び 1 2 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸
- 15 4. シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能が、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合する機能である、請求項 2 又は 3 記載の核酸。
5. EBS、SBS 及び ABS からなる群から選ばれるいずれかの転写因子結合部位の塩基配列に基づいて設計された請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。
- 20 6. 滑膜細胞、又は癌細胞にアポトーシスを誘導することができる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の核酸。
7. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、シノビオリン遺伝子の発現に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物。
8. さらに、薬学的に許容可能なキャリアーを含む、請求項 7 記載の医薬組成物。
- 25 9. 疾患が、関節リウマチ、線維症、癌及び脳神経疾患からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 7 又は 8 記載の医薬組成物。
10. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を用いて、シノビオリンの転写因子の転写活性を阻害する方法。
11. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を用いて、シノビオリンのプロ

モーター活性を阻害する方法。

1 2. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を用いて、シノビオリンのプロモーター活性を阻害することにより、シノビオリンの発現を抑制する方法。

1 3. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を用いて、滑膜細胞、又は癌細胞

5 胞にアポトーシスを誘導する方法。

要 約 書

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターに対するデコイ核酸である。また、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合してプロモーター活性を阻害することができるデコイ核酸、並びに以下の(a) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列からなるデコイ核酸、又は、(b) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、プロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸である。